



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑩ **Offenlegungsschrift**  
**DE 102 20 593 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:  
**G 01 N 21/55**  
C 08 J 7/16

②1 Aktenzeichen: 102 20 593.0  
②2 Anmeldetag: 8. 5. 2002  
④3 Offenlegungstag: 12. 6. 2003

DE 102 20 593 A 1

⑥6 Innere Priorität:  
101 58 242. 0 28. 11. 2001

⑦1 Anmelder:  
Graffinity Pharmaceuticals AG, 69120 Heidelberg,  
DE

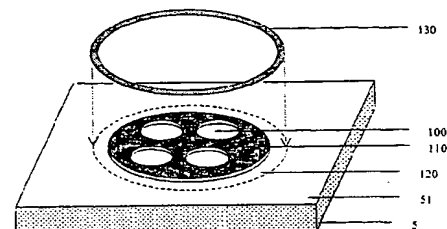
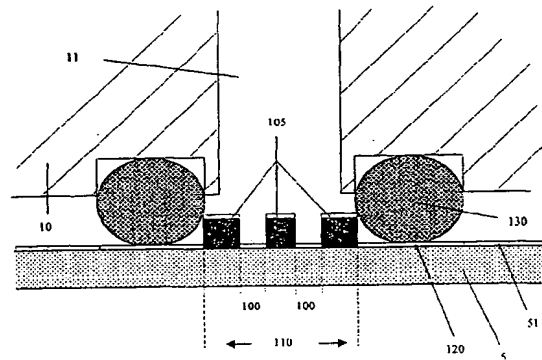
⑦4 Vertreter:  
HOFFMANN · EITLE, 81925 München

⑦2 Erfinder:  
Hill, Oliver, Dr., 69239 Neckarsteinach, DE; Burkert,  
Klaus, Dipl.-Ing., 69126 Heidelberg, DE; Dickopf,  
Stefan, Dr., 69118 Heidelberg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 SPR-Sensorflächenträger

⑤7 Beschrieben wird ein SPR-Sensorflächenträger mit einer Vielzahl von SPR-Sensorflächen (100), welche auf einem Substrat (4, 5) parallel in einer Ebene angeordnet sind, wobei Strahlung zur Anregung von Oberflächenplasmonen durch das Substrat (4, 5) geführt werden kann, um von den SPR-Sensorflächen reflektiert zu werden, Trennmitteln (105) zur Trennung der einzelnen SPR-Sensorflächen von den jeweils benachbarten SPR-Sensorbereichen, wobei die Trennmittel für jede SPR-Sensorfläche eine jeweilige Kavität bilden, und einer Vielzahl von Messbereichen (110), wobei ein Messbereich jeweils ein oder mehr SPR-Sensorflächen umfasst, und mindestens ein Messbereich von einem Isolierbereich (120) umgeben ist, welcher keine Trennmittel (105) umfasst und ausgebildet ist ein Dichtungselement (130) aufzunehmen, um zusammen mit einem auf den Messbereich aufsetzenden Volumenelement (11) einen gegenüber benachbarten Messbereichen isolierten Raum über dem mindestens einen Messbereich zu bilden.



## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Anmeldung betrifft einen SPR-Sensorflächenträger (SPR = Surface Plasmon Resonance, d. h. Oberflächenplasmonenresonanz) mit den Merkmalen des Oberbegriffs des Patentanspruchs 1. Ein solcher SPR-Sensorflächenträger ist zum Beispiel aus WO 01/63256 A1 bekannt. Die vorliegende Anmeldung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines solchen SPR-Sensorflächenträgers, sowie eine Messeinrichtung, welche einen solchen SPR-Sensorflächenträger enthält.

[0002] Betreffend eine allgemeine Darstellung des technischen Hintergrunds der SPR-Spektroskopie wird auf die oben erwähnte WO 01/63256 A1 hingewiesen, deren Inhalt hiernüt durch Bezugnahme vollkommen in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Anmeldung übernommen wird.

[0003] In WO 01/63256 wird ein strukturierter SPR-Sensorflächenträger beschrieben, welcher aus einem Glassubstrat besteht, auf dem eine Vielzahl von SPR-Sensorflächen in einem in einer Ebene liegenden zweidimensionalen Raster angeordnet sind, wobei Strahlung zur Anregung von Oberflächenplasmonen durch das Substrat geführt wird. Ebenso sind Trennmittel vorgesehen, um die einzelnen SPR-Sensorflächen von den jeweils benachbarten SPR-Sensorflächen zu trennen. Die Sensorflächen werden z. B. durch eine Goldschicht auf dem Substrat gebildet, und die Trennmittel z. B. durch einen Lack oder Silizium auf dem Substrat, so dass im Bereich der Trennmittel keine Oberflächenplasmonenresonanz auftritt. Ebenso sind gemäß eines gezeigten Beispiels die Trennmittel gegenüber den SPR-Sensorflächen erhaben, so dass die Trennmittel für jede SPR-Sensorfläche eine jeweilige Kavität bilden.

[0004] Der beschriebene SPR-Sensorflächenträger schafft ein Mittel zur gleichzeitigen Ausmessung einer Vielzahl von Sensorflächen. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Verbesserung eines solchen SPR-Sensorflächenträgers.

[0005] Diese Aufgabe wird durch das Kennzeichen des Patentanspruchs 1 gelöst, sowie durch das Verfahren nach Patentanspruch 13 und die Messeinrichtung nach Patentanspruch 24. Vorteilhafte Ausgestaltungen werden in den abhängigen Patentansprüchen beschrieben.

[0006] Erfindungsgemäß ist der SPR-Sensorflächenträger in eine Vielzahl von Messbereichen aufgeteilt, wobei ein Messbereich jeweils ein oder mehr (z. B. vier) SPR-Sensorflächen umfasst, und mindestens einer dieser Messbereiche von einem Isolierbereich umgeben ist, welcher keine Trennmittel umfasst, und ausgebildet ist ein Dichtungselement aufzunehmen, um zusammen mit einem auf den Messbereich aufzusetzenden Volumenelement einen gegenüber benachbarten Messbereichen isolierten Raum über diesem gegebenen Messbereich zu bilden.

[0007] Mit der Erfindung wird ein SPR-Sensorflächenträger geschaffen, welcher die Möglichkeit gibt, über einem oder mehreren Messbereichen ein Volumen zu schaffen, welches von benachbarten Messbereichen isoliert ist, um beispielsweise direkt auf dem SPR-Sensorflächenträger weitere Messungen an Proben vorzunehmen, die sich auf den jeweiligen SPR-Sensorflächen befinden.

[0008] Bei dem SPR-Sensorflächenträger nach WO 01/63256 A1 ist zwar eine Anordnung gegeben, bei welcher über jeder SPR-Sensorfläche eine Kavität gebildet ist, in welcher eine geringe Flüssigkeitsmenge gehalten werden kann, diese Menge ist jedoch sehr begrenzt, und im allgemeinen ungeeignet, um weitergehende Analysen vorzunehmen, z. B. Viren zu vermehren, welche an einem auf einer SPR-Sensorfläche angebrachten Liganden gebunden wurden, wobei die Bindung mittels SPR festgestellt wurde.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung ist es möglich, ein Volumenelement auf den SPR-Sensorflächenträger zu setzen, so dass über einem oder mehr Messbereichen jeweilige Volumina entstehen, welche ausreichend groß sind, um gewünschte weitere Messungen und Analysen vorzunehmen. Dies schafft den bedeutenden Vorteil, dass solche weiteren Mess- und Analyseschritte direkt auf dem SPR-Sensorflächenträger stattfinden können, was die Durchführung der Messungen stark vereinfacht und den apparativen Gesamtaufwand verringert, da keine getrennten Messvolumina vorgesehen werden müssen.

[0009] Weitere Vorteile und Aspekte der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden ausführlichen Beschreibung von bevorzugten Ausführungen besser verständlich, welche Bezug nehmen auf die Figuren, bei welchen

[0010] Fig. 1a-1c Perspektivansichten von erfindungsgemäßen SPR-Sensorflächenträgern zeigen;

[0011] Fig. 2 eine geschnittene Perspektivansicht und einen vergrößerten Abschnitt eines erfindungsgemäßen SPR-Sensorflächenträgers und eines Volumenelements zeigt; und

[0012] Fig. 3 eine Schnittansicht und eine Perspektivansicht eines Messbereichs und zugehörigen Dichtungselements zeigt.

[0013] In Fig. 1a ist eine erste Ausführung der Erfindung gezeigt, bei welcher eine Vielzahl von Messbereichen 110, welche in dem gezeigten Beispiel jeweils vier SPR-Sensorflächen 100 umfassen, auf einem Prisma 4 angeordnet sind, welches in diesem Beispiel als Substrat des SPR-Sensorflächenträgers dient. Ebenfalls abgebildet ist eine Küvettenumrandung 9, welche vorzugsweise um die Gesamtanordnung von Messbereichen 110 angebracht ist. Ebenfalls abgebildet ist ein Lichtstrahl 6, welcher durch das Prisma 4 (den SPR-Sensorflächenträger) geführt wird, um eine Oberflächenplasmonenresonanz in den SPR-Sensorflächen 100 anzuregen.

[0014] Fig. 1b zeigt eine weitere Ausführung der Erfindung, bei welcher ein plattenförmiges Substrat 5 die SPR-Sensorflächen 100 und die Messbereiche 110 trägt. Ähnlich wie in der Ausführung der Fig. 1a ist auch eine Küvettenumrandung 9 vorgesehen. Um mit diesem SPR-Sensorflächenträger eine Messung durchzuführen, wird dieser auf eine Oberfläche 7 eines Prismas 4 aufgebracht, so dass Licht (allgemeiner: SPRanregende Strahlung) 6 durch das Prisma 4 und die Platte 5 zu den SPR-Sensorflächen 100 geführt werden kann. Vorzugsweise geschieht dies durch Einsatz einer Indexflüssigkeit 8 zwischen dem Prisma 4 und der Platte 5, damit das unter SPR-Bedingungen eingestrahle Licht 6 nicht an der Grenzfläche der Oberfläche 7 am Luftspalt vor der Platte 5 reflektiert wird. Somit dringt das Licht durch die Indexflüssigkeit 8 in den darüber befindlichen lichtdurchlässigen Probenkörper 5 ein und wird erst an der mit SPR-fähigem Material beschichteten Seite der SPR-Sensorflächen 100 reflektiert. Ein Beispiel für eine Indexflüssigkeit ist Ölsäure oder eine Ölsäure enthaltende Mischung.

[0015] Als Material für das Prisma 4 bzw. die Platte 5 kommt jedes für SPR-fähige Strahlung transparente Material in Frage, auf dem ein SPR-fähiges Material in den SPR-Sensorflächen 100 aufgebracht werden kann. Zum Beispiel kann das Substrat 4 oder 5 aus Glas bestehen, und die SPR-Sensorflächen können durch eine Metallbeschichtung gebildet sein, insbesondere durch eine Goldschicht.

[0016] Wie in den Fig. 1a bis 1c abgebildet, wird bevorzugt, dass die Messbereiche 110 in zwei Dimensionen adressierbar sind. Der Begriff "adressierbar" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass einzelne Messbereiche mittels einer entsprechenden Identifizierung bzw. Adresse voneinander unterschieden werden können, so dass dementsprechend auch damit in Beziehung stehende Proben adressiert werden

können. Dies schafft den Vorteil, dass eine sehr große Zahl von Messbereichen 110 gleichzeitig belichtet und ausgewertet werden können. Es ist jedoch innerhalb des Umfangs der Erfindung auch möglich, die Messbereiche in einer Dimension adressierbar anzuordnen.

[0017] Es wird besonders bevorzugt, dass die Messbereiche 110 in einem kartesischen Raster angeordnet sind, wie in Fig. 1 abgebildet, wobei die Adressierbarkeit dann am einfachsten durch kartesische Koordinaten gegeben ist. Die vorliegende Erfindung ist jedoch keinesfalls darauf beschränkt, und die Messbereiche können in einem beliebigen Raster oder auch vollkommen ungeordnet verteilt sein, und können unabhängig von ihrer speziellen Anordnung nach beliebigen Koordinaten (z. B. nach Polarkoordinaten) adressiert werden.

[0018] Nun wird unter Bezugnahme auf Fig. 3 ausführlicher die Struktur eines einzelnen, beispielhaften Messbereichs 110 und eines zugehörigen Isolierbereichs 120 beschrieben. In Fig. 3 unten ist schematisch der Träger 5 gezeigt, auf dem sich eine Goldschicht 51 befindet. Der Einfachheit halber ist nur ein Messbereich 110 abgebildet. Der Messbereich 110 umfasst in dem gezeigten Beispiel vier SPR-Sensorflächen 100. Es sei jedoch bemerkt, dass ein Messbereich auch mehr oder weniger SPR-Sensorflächen 100 umfassen kann. Der Messbereich 110 wird durch geeignete Trennmittel 105 (wofür Beispiele später beschrieben sind) gebildet, welche wie in Fig. 3 oben in Schnittansicht dargelegt, auf dem Träger 5 aufgebracht sind, und die Goldschicht 51 von Träger trennen, so dass SPR-Sensorflächen 100 gebildet werden, in welchen die Goldschicht auf dem Träger 5 aufgebracht ist (möglicherweise mit einer dazwischenliegenden Schicht zur Haftungsvermittlung zwischen der Goldschicht 51 und dem Träger 5) und Trennmittelbereiche, bei welchen die Trennmittel 105 auf dem Träger bzw. Substrat 5 (ebenfalls möglicherweise mit einer haftungsvermittelnden Zwischenschicht) aufgebracht sind. Somit, wenn Licht von unten durch den Träger 5 auf die obere Oberfläche auftrifft, kann in den SPR-Sensorflächen 100 bei geeigneten Winkel- und Wellenlängenbedingungen der eingestrahnten SPR-Strahlung einer Oberflächenresonanz auftreten, während die Trennmittel so beschaffen sind, dass dort keine Oberflächenresonanz auftritt, so dass die SPR-Sensorflächen durch die Strukturierung der Oberfläche des Trägers 5 klar voneinander getrennt sind.

[0019] Erfindungsgemäß wird der gezeigte Messbereich 110 von einem Isolierbereich 120 umgeben. Der Isolierbereich 120 ist ausgebildet ein Dichtungselement 130 aufzunehmen, um zusammen mit einem auf dem gezeigten Messbereich 110 aufzusetzenden Volumenelement 11 (siehe Fig. 3 oben) einen isolierten Raum über diesen Messbereich zu bilden.

[0020] Man erkennt, dass der Isolierbereich 120 keine Trennmittel 105 umfasst. Damit ist sichergestellt, dass eine gute Abdichtung durch das Dichtungselement 130 erfolgen kann.

[0021] Vorzugsweise ist der Isolierbereich 120 an der dem Substrat 5 abgewandten Oberfläche gleich beschaffen wie die SPR-Sensorflächen. Dies ist in Fig. 3 oben erkennbar, da sowohl die SPR-Sensorfläche als auch der Isolierbereich 120 die Goldfläche 51 präsentieren. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind nicht nur die Oberflächen gleich beschaffen, sondern die SPR-Sensorflächen und Isolierbereiche sind insgesamt gleich beschaffen, d. h. weisen die gleiche Schichtfolge vom Substrat 5 bis zur Oberfläche auf. In anderen Worten, vorzugsweise werden die SPR-Sensorflächen 100 und die Isolierbereiche 120 durch dieselben Verfahrensschritte hergestellt, so dass keine gesonderten Verfahrensschritte zur jeweiligen Herstellung notwendig

sind.

[0022] Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass der Isolierbereich 120 an der dem Substrat 5 abgewandten Oberfläche anders beschaffen ist als die SPR-Sensorflächen 100. Zum Beispiel kann ein Isolierbereich 120 durch eine freiliegende Substratoberfläche gebildet sein. Als weitere Alternative ist es möglich, dass ein Isolierbereich 120 an seiner Oberfläche eine dichtungsfördernde Schicht aufweist, welche aus einem auf die Dichtungselemente 130 abgestimmtes Material besteht, z. B. Silikon. Diese dichtungsfördernde Schicht kann auf jede gewünschte oder praktische Art aufgebracht werden, z. B. mittels einer Maske, mittels eines Roboters, der die einzelnen Isolierbereiche ansteuert, oder auch von Hand. [0023] Gemäß einer bevorzugten Ausführung sind die Trennmittel 105 nicht nur gegenüber dem SPR-Sensorbereichen erhaben, um somit jeweilige Kavitäten an den SPR-Sensorflächen zu bilden, sondern auch gegenüber dem Isolierbereich 120, wie in Fig. 3 abgebildet. Somit ist es bei geeigneter Dimensionierung des Isolierbereichs 120 und des Dichtungselements 130 möglich, dass die Trennmittel 105, welche den Umfang des Messbereichs 110 bilden, als Führung für das Dichtungselement 130 dienen. Damit wird die Platzierung der Dichtungselemente 130 erleichtert.

[0024] Wie es in Fig. 3 abgebildet ist, sind die Messbereiche 110 und die zugehörigen Dichtungselemente 130 bevorzugt rund oder oval ausgebildet. Es sei jedoch bemerkt, dass die Erfindung auf beliebige geometrische Formen des Außenumfangs von Messbereichen und Dichtungselementen angewendet werden kann.

[0025] In Fig. 3 ist ein einzelnen Messbereich 110 mit zugehörigem Isolierbereich 120 gezeigt. Obwohl es grundsätzlich möglich ist, dass eine Vielzahl von Messbereichen vorgesehen wird (wie in Fig. 1 gezeigt), und nur einer oder einige wenige dieser Messbereiche von zugehörigen Isolierbereichen umgeben werden, wird bevorzugt, dass jeder der Vielzahl von Messbereichen 110 eines gegebenen SPR-Sensorflächenträgers von einem zugehörigen Isolierbereich 120 umgeben wird. Damit erreicht man den Vorteil, dass durch Aufsetzen eines entsprechenden Dichtungselements und Volumenelements über jedem beliebigen Messbereich 110 ein Volumen gebildet werden kann, um weitere Messungen und Analysen vorzunehmen.

[0026] Nun wird ein Verfahren zur Herstellung eines SPR-Sensorflächenträgers nach den oben beschriebenen Ausführungen dargelegt. Vorzugsweise geschieht dies durch Bilden bzw. Aufbringen der Trennmittel 105 auf dem jeweiligen Substrat, z. B. der Platte 5 oder dem Prisma 4, so dass zwischen den Trennmitteln 105 freie Bereiche entstehen, welche SPR-Sensorflächen 110 und Isolierbereiche 120 definieren, und danach Aufbringen eines SPR-geeigneten Materials zumindest in den freien Bereichen, welche SPR-Sensorflächen 100 definieren.

[0027] Wird das SPR-geeignete Material (z. B. Gold) nur in den freien Bereichen aufgebracht, welche SPR-Sensorflächen definieren, dann entsteht ein SPR-Sensorflächenträger, bei dem die Isolierbereiche durch das freiliegende Substrat bzw. die direkt unter der Goldschicht liegende Schicht gekennzeichnet sind. Wird das SPR-geeignete Material auch in den freien Bereichen aufgebracht, welche Isolierbereiche definieren, so entsteht ein SPR-Sensorflächenträger, wie er in Fig. 3 abgebildet ist, nämlich bei welchem die SPR-geeignete Schicht sowohl in den SPR-Sensorflächen 100 als auch in den Isolierbereichen 120 präsentiert wird.

[0028] Als ergänzenden Schritt, egal ob das SPR-geeignete Material auf die Isolierbereiche aufgebracht wurde oder nicht, kann eine dichtungsfördernde Schicht (z. B. Silikon) auf den Isolierbereichen angebracht werden.

[0029] Der Schritt zur Bildung der Trennmittel 105 kann

z. B. durchgeführt werden durch Aufbringen eines Polymers auf der Oberfläche des Substrats **4** oder **5**. Vorzugsweise umfasst dies die Schritte des Aufbringens eines photostrukturierbaren Polymers auf der gesamten Oberfläche des Substrats **4** oder **5**, das Belichten der aufgetragenen Polymerschicht mit einer Maske, welche Bereiche definiert, die zu den Trennmitteln **105** gehören, Bereiche, die zu den SPR-Sensorflächen **100** gehören, und Bereiche, die zu den Isolierbereichen **120** gehören, und das Bearbeiten der belichteten Polymerschicht, um in den Bereichen, die zu den SPR-Sensorflächen **100** und den Isolierbereichen **120** gehören, die Substratoberfläche freizulegen.

[0030] Eine Alternative bei der Aufbringung eines Polymers für die Trennmittel ist das Aufbringen eines Polymers auf der Oberfläche des Substrats **4** oder **5** in einem zweidimensionalen Raster, das die Trennmittel **105**, die SPR-Sensorflächen **100** und die Isolierbereiche **120** definiert, und das Aushärten des Polymers. Bei dieser Alternative wird das Polymer vorzugsweise mittels einer Siebdrucktechnik aufgebracht.

[0031] Als Alternative zur Bildung der Trennmittel durch ein Polymer, können die Trennmittel auch durch eine strukturierbare Siliziumschicht gebildet werden.

[0032] Bei allen oben dargelegten Herstellungsverfahren geschieht der Schritt zur Aufbringung des SPR-geeigneten Materials vorzugsweise durch Abscheiden eines Metalls, wobei möglicherweise vor der Abscheidung des Metalls eine haftungsvermittelnde Schicht aufgebracht wird. Besonders bevorzugt wird, dass das Metall auf der gesamten Oberfläche des strukturierten Substrats aufgedampft wird, so dass es dann auch die Trennmittel bedeckt, wie in **Fig. 3** oben schematisch dargestellt.

[0033] Wie bereits beschrieben, ist der SPR-Sensorflächenträger nach der Erfindung so ausgebildet, dass der Isolierbereich **120** ein Dichtungselement **130** aufnehmen kann, um zusammen mit einem Volumenelement **11** einen isolierten Raum über dem Messbereich zu bilden. Das Volumenelement **11** kann auf jede geeignete oder gewünschte Art und Weise bereitgestellt werden, z. B. als zylindrisches Einzelelement, welches mit einem einzelnen Dichtungselement **130** verbunden wird. Vorzugsweise werden jedoch mehrere Volumenelemente **11** als Teil eines Volumenelementträgers **10** vorgesehen, wie z. B. in **Fig. 2** gezeigt. Genauer gesagt zeigt **Fig. 2** eine Messeinrichtung, welche aus einem SPR-Sensorflächenträger **5** und einem Volumenelementträger **10** besteht, die so miteinander wechselwirken, dass über den jeweiligen Messbereichen **110** Räume gebildet sind.

[0034] Obwohl es möglich ist, dass die einzelnen Volumenelemente lösbare Bestandteile eines Volumenelementträgers **10** sind, wird bevorzugt, dass der Volumenelementträger **10** ein Körper ist, in dem die Volumenelemente **11** als Bohrungen bzw. Ausnehmungen gebildet sind. Der Volumenelementträger **10** kann z. B. durch spanende Bearbeitung (z. B. Fräsen oder Bohren) hergestellt werden, aus einem Kunststoff (z. B. Teflon) oder Metall (z. B. Aluminium). Als alternative Kunststoffe kommen Thermoplaste (z. B. Polystyrol oder Polypropylen) in Frage, auch wenn sich diese für eine spanende Bearbeitung weniger eignen als z. B. metallische Werkstoffe. Neben der spanenden Bearbeitung eines Materialblocks kann der Volumenelementträger auch mittels eines Gussverfahrens (z. B. Spritzguss) in die gewünschte Form gebracht werden. Bei Einsatz von Spritzguss ist jedes dafür geeignete, formbare oder sich verfestigende Material geeignet, z. B. die oben erwähnten thermoplastischen Elastomere, wie Polystyrol oder Polypropylen, oder auch gussfähige Metalle.

[0035] Wenn der Volumenelementträger wiederholt in Verfahren eingesetzt werden soll, bei denen Viren, Bakterien

oder andere potentiell ansteckende biologische Entitäten verwendet werden, werden bevorzugt Materialien gewählt, die resistent sind gegen eine chemische Sterilisation (z. B. Behandlung mit Zitronensäure, NaOH/SDS). Ein solches Material ist beispielsweise PolyChloroTriFluoroEthylen (PCTFE).

[0036] Vorzugsweise, wie in **Fig. 2** gezeigt und auch in **Fig. 3** oben angedeutet, sind die Dichtungselemente **130** Bestandteile des Volumenelementträgers **10**. Die Dichtungselemente **130** können hierbei fest oder lösbar mit dem Volumenelementträger **10** verbunden sein. Vorzugsweise sind an der Seite des den Volumenelementträger bildenden Körpers um die Öffnungen, welche Volumenelemente **11** definieren, Nuten vorgesehen, in welcher die Dichtungselemente **130** platziert werden. In diesem Fall sind die Dichtungselemente vorzugsweise O-Ringe.

[0037] Es ist jedoch auch möglich, dass die Dichtungselemente und der Volumenelementträger einstückig ausgebildet sind. Dies ist z. B. möglich, wenn der Volumenelementträger durch Spritzguß aus einem geeigneten Kunststoff hergestellt wird, welcher eine hinreichende Flexibilität für die Dichtungselemente hat. In diesem Fall können die Dichtungselemente als vorstehende Wulste in einer auf die Messbereiche abgestimmten Form (z. B. als Ringwulste für runde oder ovale Messbereiche) auf der Seite des Volumenelementträgers gebildet werden, welche auf den SPR-Sensorflächenträger aufzusetzen ist.

[0038] Allgemein sind als Dichtungselemente Weichstoffdichtungen geeignet, z. B. aus Kunststoff. Kautschuk, Silikon, Teflon, o. ä., die in Ring-, Lamellen- oder Mattenausführung einsetzbar sind. Desweiteren können Vakuumdichtungen eingesetzt werden.

[0039] Vorzugsweise haben der SPR-Sensorflächenträger und der Volumenelementträger **10** jeweilige Justierelemente, z. B. Passstifte und Führungen **13** (siehe **Fig. 2**), damit die Dichtungselemente **130** mit den zugeordneten Isolierbereichen **120** ausgerichtet werden können. Die Toleranzen für die Passstifte und Führungen sind auf die Dimensionen der Messbereiche bzw. Isolierbereiche und Dichtungselemente abgestimmt, damit die gewünschte Passgenauigkeit zwischen den Dichtungselementen und Isolierbereichen erzielt werden kann. Vorzugsweise ist die Passgenauigkeit der Passstifte und Führungen in der Größenordnung von 20 µm oder weniger.

[0040] Weiterhin wird bevorzugt, dass der SPR-Sensorflächenträger und der Volumenelementträger jeweilige Befestigungselemente **15** aufweisen, um den SPR-Sensorflächenträger und den Volumenelementträger fest miteinander zu verbinden. Vorzugsweise sind die Befestigungselemente **15** so, dass die Verbindung auch wieder gelöst werden kann. Die Verbindungselemente **15** können z. B. eine Druckverbindung sein, wie eine Schraub- oder Klemmverbindung. In anderen Worten, die Befestigungselemente können z. B. Führungen sein, in welche eine Metallklammer eingeschoben wird, um den SPR-Sensorflächenträger und den Volumenelementträger miteinander zu verbinden. Alternativ können die Verbindungselemente mit Innengewinde versehene Bohrungen sein, in welche eine äußere Schraube eingedreht wird, um den SPR-Sensorflächenträger und den Volumenelementträger miteinander zu verbinden.

[0041] Möglich ist auch, dass die Justierelemente **13** und die Befestigungselemente **15** identisch sind, was z. B. bei dem oben angegebenen Beispiel der Gewinde-Bohrungen möglich wäre, da das Eindrehen der äußeren Schraube zum einen den SPR-Sensorflächenträger und den Volumenelementträger verbindet, und andererseits durch die Ausrichtung der Bohrungen ein Justierung bewirkt. Man beachte allerdings, dass die Toleranzen die erforderliche Passgenauig-

keit schaffen müssen. Daher wird bevorzugt, dass die Justierelemente 13 und die Befestigungselemente 15 separat sind, da dann die Anforderungen an die Toleranzen bei den Befestigungselementen geringer sein können.

[0042] Nun wird ein Verfahren zur Selektion und Identifizierung von Peptid- oder Proteinmolekülen mittels Phage Display beschrieben, welches eine bevorzugte Anwendung des oben beschriebenen SPR-Sensorflächenträgers und der aus SPR-Sensorflächenträger, Dichtungselementen und Volumenelementen bestehenden Messeinrichtung ist.

[0043] Selektion- und Identifikationsverfahren haben zum Verständnis vieler biologischer Prozesse geführt. Die üblichen experimentellen Ansätze waren dabei bisher zellbasiertes Screening und Affinitätschromatographie. Obwohl beide Techniken bei der Entdeckung von Peptid- oder Proteinmolekülen hilfreich sind, ist eine Methode, welche die Proteinidentifikation mit der Genisolierung koppelt, sehr wünschenswert.

[0044] Diesen Ansatz verfolgen Phage Display Screeningsysteme. Die dabei angewandte Kombination von in vitro-Genexpressionstechniken mit traditionellen biochemischen Ansätzen wie z. B. der Affinitätschromatographie bietet die Möglichkeit der funktionellen Genselektion, indem eine direkte Verbindung zwischen der natürlichen Produktaffinität und der Genstruktur hergestellt wird.

[0045] Beim Phage Display werden Gene, die für nicht-virale Proteine oder Peptide codieren, so in das virale Genom inkorporiert, dass Fusionsproteine zwischen dem gewünschten nicht-viralen Protein oder Peptid und einem viralen Hüllprotein generiert werden. Dadurch wird bei der Replikation des Virus im Wirt das Fusionsprotein an der Oberfläche des Virus präsentiert. In einer typischen Phage Display Bibliothek wird eine Vielzahl von DNA Fragmenten, die für nicht-virale Proteine oder Peptide codiert, in das virale Genom inseriert. So werden virale Partikel, die eine Vielzahl von Proteinen oder Peptiden an der Oberfläche präsentieren generiert.

[0046] Diese Phage Display Bibliothek wird dann mit einer auf einem Träger immobilisierten Probe in Kontakt gebracht. Beim darauffolgenden Waschschritt werden Viren, die Fusionsproteine präsentieren, welche mit der immobilisierten Probe unter Ausbildung einer Bindung interagieren, auf dem Träger zurückgehalten, wohingegen Viren, die nicht interagierende Fusionsproteine präsentieren, weggeschwungen werden. Die interagierenden Viren werden eluiert und durch Infektion einer Wirtskultur amplifiziert. Wiederholte Amplifizierungs- und Selektionsrunden können erforderlich sein, um eine verhältnismäßig homogene Virenpopulation zu erhalten, die an die immobilisierte Probe mit hoher Affinität bindet. Anschließend werden von einzelnen Virenklonen die inserierten DNA Abschnitte sequenziert und daraus die Aminosäuresequenzen der interagierenden Proteine oder Peptide abgeleitet.

[0047] Die Immobilisierung eines Interaktionspartners (Liganden) ist notwendig, um die Separation der Viren-Ligand-Komplexe von den nicht interagierenden Viren zu ermöglichen. Außerdem erleichtert sie die Prozeßführung, wie z. B. das Durchführen von Waschschritten, und vermag in Verbindung mit einem geeigneten Detektionsverfahren Auskunft über das Vorhandensein und die Stärke der Wechselwirkungen zwischen den Interaktionspartnern zu geben.

[0048] Häufig werden sphärische Beads (quervernetzte Polymere in Partikelform) als Träger für die Virenselektion verwendet. Beads können beispielsweise zu Affinitätsäulen aufgeschichtet werden. Ein grosser Nachteil bei der Verwendung dieser Bead-Affinitätsäulen ist, dass keine räumliche Zuordnung der Beads möglich ist. Dies stellt ein erhebliches Problem bei der Automatisierung und Miniaturisierung von

Bead-basierten Phage Display Verfahren dar. Weiterhin nachteilig ist die aufwendige Handhabung der Beads, z. B. bei der Durchführung von Waschschritten. Von Nachteil ist zudem, dass sich zwischen den sphärischen Beads Zwischenräume bilden, in denen sich Totvolumina an Virensuspension ansammeln.

[0049] Vorteilhafter wäre es daher, einen Träger zur Virenselektion zu verwenden, der die Immobilisierung einer Vielzahl von Liganden sowie eine universelle/einfache Handhabung gewährleistet und somit eine Automatisierung und Miniaturisierung des Verfahrens ermöglicht. Für die Automatisierung und Miniaturisierung des Verfahrens spielt die Geometrie des für die Virenselektion verwendeten Trägers eine wichtige Rolle. Vorteilhaft hierfür ist es, wenn die auf dem Träger immobilisierten Interaktionspartner in einem regelmäßigen Raster und positionsadressierbar angeordnet sind. Für die Automatisierung und Miniaturisierung des Verfahrens wäre es weiterhin sehr vorteilhaft, wenn sowohl die Selektion als auch die Detektion von Bindungsergebnissen auf der identischen Oberfläche durchgeführt werden könnten. Um den einfachen Einsatz leistungsstarker Roboter zum Pipettieren oder ähnlichem zu ermöglichen, sollten die Behältnisse außerdem nach oben hin offen sein. Eine Mikrotiterplatte oder ein planarer Träger (z. B. eine Membran) erfüllen beispielsweise diese Voraussetzungen.

[0050] In WO 01/02554 wird ein parallelisiertes Verfahren zur Identifizierung von Interaktionspartnern mittels Phage Display beschrieben, in dem magnetische Partikel für die Immobilisierung der Liganden verwendet werden. Alle Selektionen werden in räumlich getrennten Volumen zeitgleich in Mikrotiterplatten vorgenommen. Der notwendige Transfer der magnetischen Partikel erfolgt automatisiert mittels eines speziellen Magnetarrays. Hierbei werden die magnetischen Partikel mit den Ligand-Virenkomplexen an die Magnete des Arrays gebunden und zwischen den Gefäßen transferiert. Die Diskriminierung zwischen interagierenden und nicht interagierenden Viren wird mit einem ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) basiertem Verfahren in einem der Selektion nachgeschalteten Prozess durchgeführt.

[0051] Ein großer Nachteil an der Verwendung von Mikrotiterplatten als Inkubationsgefäß ist, dass die Kavitäten nur ein relativ kleines Probenvolumen (z. B. 0,2–1,2 ml Volumen pro Kavität bei handelsüblichen 96er-Mikrotiterplatten; 20–60 µl bei 384er Mikrotiterplatten) für die Selektion zulassen. Durch diese Volumenlimitierung der Kavitäten ist es oft notwendig, vor dem Screening die Viren anzureichern. So werden beispielsweise bei Lysaten des Bakteriophagen T7 üblicherweise Phagentiter zwischen  $1 \times 10^{10}$ – $1 \times 10^{11}$  pfu/ml (Plaque Forming Units) erzielt. Für ein erfolgreiches Screening kann es jedoch notwendig sein, eine Gesamtanzahl von Phagen zwischen  $1 \times 10^{10}$ – $1 \times 10^{11}$  pfu/ml oder größer mit dem Affinitätsliganden in Kontakt zu bringen, so dass vor dem Mikrotiterplatten basierten Screening aufgrund des limitierten Probenvolumens der einzelnen Kavitäten (siehe oben) die Aufkonzentrierung der Viren aus dem Lysat nicht vermeidbar ist (T7Select® System Manual, Fa. Novagen, Madison (USA) (TB178 06/00), S. 6 ff). Üblicherweise geschieht dies durch Polyethylenglykol vermittelte Fällung der Viren aus dem Kulturüberstand und nachfolgender Sedimentation des Präzipitats. Nachteilig hieran ist, dass die sich hierbei bildenden Virenpräzipitate oft nur schwer wieder in Lösung bringen lassen. Der Screeningprozess wird somit durch das Löslichkeitsverhalten der im Präzipitat befindlichen Viren negativ beeinflusst. Weiterhin sind die mit der Fällung der Viren verbundenen Arbeitsschritte zeitintensiv und schwer automatisierbar.

[0052] Vorteilhafter ist ein Verfahren, bei dem die aus der

Vermehrung der Phagenbibliothek resultierenden Kulturüberstände/Lysate unmittelbar in dem Screeningprozess verwendet werden können. Dies wird durch die Verwendung von Inkubationsgefäßen mit einem größeren Probenvolumen als es die Kavitäten von Mikrotiterplatten zulassen, ermöglicht.

**[0053]** Weiterhin nachteilig ist, dass eine konkurrierende, zeitgleiche Selektion strukturell ähnlicher Liganden gegen die Phagenbibliothek durch die getrennten Volumina ausgeschlossen ist, da pro Kavität nur ein Ligand immobilisiert werden kann. Vorteilhaft ist eine in einem gemeinsamen Probenvolumen stattfindende Selektion der Interaktionspartner, bei der die immobilisierten Interaktionspartner in einem positionsadressierbaren, zweidimensionalen Array angeordnet sind. Geeignet hierfür sind planare Träger (z. B. Membranen), die in dafür geeigneten großvolumigen Gefäßen (Schalen oder Röhren) inkubiert werden oder selber ein Gefäß darstellen.

**[0054]** Um eine gleichmäßige Verteilung der Phagenpopulation über die gesamte Trägeroberfläche zu erreichen, ist es vorteilhaft, eine gleichmäßige Durchmischung der Probenflüssigkeit zu gewährleisten. Dies kann beispielsweise dadurch bewerkstelligt werden, dass das den Träger beinhaltende oder bildende Gefäß mittels einer Kippvorrichtung bewegt wird.

**[0055]** Hawlisch et al. (Analytical Biochemistry 293, 142-145 (2001)) beschreiben ein Verfahren zur Selektion Epitop-spezifischer scFv-Fragmente mittels eines M13-basierten Virensystems. Für die Selektion wurde ein auf Cellulosemembranen synthetisierter Peptidarray verwendet, der einen Teil der Primärsequenz des humanen C3a-Rezeptors in Form von fünfzig in der Sequenz überlappenden, 15-Mer-Peptiden repräsentiert. Alle mit dem Array interagierenden Viren wurden nach jeder Selektionsrunde gemeinsam eluiert und gemeinsam vermehrt. Die Identifizierung interagierender Viren erfolgte in einem separaten Bindungsassay (ELISA) mit der kompletten Proteindomäne als Ligand. Hierfür wurde ein Teil der selektierten Viren nach der vierten Selektionsrunde klonal vereinzelt, 92 Klone separat vermehrt und in dem Bindungsassay analysiert. Als Selektionserfolg wurde die Zunahme ELISA-positiver gegenüber ELISA-negativen Viren gewertet. Eine Zuordnung ELISA-positiver Viren als Bindungspartner gegenüber den individuellen Affinitätsliganden des für die Selektion verwendeten Arrays erfolgte durch weitere ELISA-basierte Assays. Hierfür wurde der gesamte Array mit einem einzelnen Virenklon in Kontakt gebracht und über die Position des Bindungssignals die Zuordnung des Virenklons zu einem oder mehreren Affinitätsliganden des Arrays getroffen. Für jeder Virenklon muß also ein separater Assay gegen alle im Array enthaltenen Affinitätsliganden durchgeführt werden. Die Zuordnung der Virenklone zu den einzelnen, im Array immobilisierten Affinitätsliganden erfolgte in einem weiteren Bindungsassay (ELISA), der auf dem Array durchgeführt wurde.

**[0056]** Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass ein gemeinsamer ELISA zur Identifizierung interagierender Virenklone nur bei der Verwendung peptidischer Affinitätsliganden, die sich aus einer gemeinsamen Protein/Polypeptidsequenz ableiten, möglich ist. Bei Verwendung von nicht-peptidischen Affinitätsliganden, die eine kombinatorische Vielfalt darstellen, muss für jeden im Array verwendeten Affinitätsliganden ein Bindungsassay durchgeführt.

**[0057]** Nachteilig bei der Verwendung von Membranen als Oberfläche ist, daß die lokale Konzentration des Liganden nur aufwendig kontrollierbar ist. Dies kann durch lokale Aviditätseffekte zur Bildung unspezifischer Viren-Ligand-Komplexe führen.

**[0058]** Ein sehr großer Nachteil am obengenannten Verfahren des Standes der Technik ist, dass die räumliche Information des Arrays in Bezug auf die Liganden bei der Selektion verlorengeht, da die interagierenden Viren

- i) nicht auf dem Array nachgewiesen werden können und
- ii) nicht ortsspezifisch vom Array eluiert werden können.

**[0059]** Um die räumliche Anordnung der Liganden in einem zweidimensionalen Raster zur Identifizierung von mit Viren interagierenden Liganden zu nützen, ist

- i) ein Messsystem erforderlich, mit dem die Bindung der Viren während der Selektion nachgewiesen werden kann sowie
- ii) eine Methode erforderlich, mittels derer gebundene Viren ortsspezifisch vom Array eluiert werden können.

**[0060]** Um Interaktionen der Viren mit den immobilisierten Liganden während der Selektion nachweisen zu können, müssen die Selektion und Detektion des Selektionserfolges in demselben Messsystem durchführbar sein. Werden Marker-basierte Nachweismethoden (z. B. ELISA-Assays) eingesetzt, wird der der Selektion zugrunde liegende Bindungsassay in der Ausführung auf die Konditionen der Markierungsreaktion eingeschränkt, so dass eine für die Selektion vorteilhafte Variation des Bindungsassays, z. B. Änderung des pH-Wertes, der Ionenstärke oder die Verwendung von Detergentien, nicht möglich ist.

**[0061]** Ein großer Nachteil der im obengenannten Verfahren verwendeten Marker-basierten Nachweismethode ist weiterhin, dass die im Selektionsprozess identifizierten Viren nicht für die weiteren Verfahrensschritte verwendet werden können. Werden Markermoleküle (z. B. Antikörper, Streptavidin) verwendet, setzen diese eine physische Wechselwirkung zwischen den Ligand-Virenkomplexen und dem Markierungsreagenz voraus. Diese physische Wechselwirkung kann zu einer Veränderung der Bindung zwischen dem Liganden und dem Virus (Abschwächung oder Verstärkung) oder aber zu einer Beeinträchtigung der Wirt-Virus-Wechselwirkung (Verlust der Infektiosität) führen. Bei Verwendung von Marker-basierten Nachweisverfahren ist zu erwarten, dass sich unlösliche Aggregate bilden, so dass die darin enthaltenen Viren für weitere Verfahrensschritte nicht verfügbar sind.

**[0062]** Um die Selektion und die Detektion in demselben Meßsystem durchführen zu können und identifizierte Viren in den weiteren Verfahrensschritten verwenden zu können, sollte folglich ein markierungsfreies Detektionsverfahren (wie z. B. die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)) verwendet werden. Dies hat zudem den Vorteil, dass die direkte Bindung des auf dem Viren präsentierten Peptids oder Proteins mit dem Liganden nachgewiesen werden kann.

**[0063]** Ein Verfahren, bei dem Bindungsereignisse während des Selektionsprozesses mittels einer markierungsfreien Detektionsmethode, nämlich der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) nachgewiesen werden, wurde von Malmberg et al. (J. Immunol. Methods 198 : 51-57 (1996)) für die Selektion von M13-Viren-basierten Antikörperbibliotheken gegen einen auf einem BIAcore™ Biosensor immobilisierten Liganden beschrieben. Hierfür wurden in drei unterschiedlichen Ansätzen die als Liganden verwendeten Proteine (Lysozym, HM90-5, pB-1) jeweils kovalent an die Dextranmatrix eines Sensorchips gekoppelt und ein begrenztes Volumen einer Phagenbibliothek im kontinuierlichen Fluss über die Sensoroberfläche geleitet. Nachfolgend

wurden die Viren mit einem Laufmittel bei kontinuierlichem Fluss von der Oberfläche eluiert und das Eluat zeitlich fraktioniert gesammelt. Der Verlauf der auf der Sensoroberfläche durchgeführten Selektion wurde mittels zeitaufgelöster SPR-Messung in einem BIAcore™-Gerät beobachtet. Die im Eluat enthaltenen Viren wurden vereinzelt und vermehrt. Als primärer Selektionserfolg wurde die Zunahme des mittels ELISA ermittelten Verhältnisses von Binden zu Nichtbindern der im Eluat enthaltenden Virenkclone gewertet. Nachfolgend wurden die durch die interagierenden Viren kodierten Antikörper rekombinant hergestellt und deren Dissoziationskonstante gegenüber dem auf dem Sensorchip immobilisierten Ligand ermittelt.

[0064] Ein sehr großer Nachteil dieses Verfahrens ist, dass ein Durchflusssystem verwendet wird. Dadurch ist die Anordnung der Sensoroberflächen in eindimensionaler Richtung vorgegeben ist (eindimensionaler Array). Nachteilig hierbei ist, dass gerade durch die Verwendung eines Durchflusssystems eine zweidimensionale Probenanordnung (zweidimensionaler Array) und deren Miniaturisierung unmöglich ist.

[0065] Weiterhin ist die konkurrierende Affinitätsselektion in einem Durchflusssystem nur umständlich zu realisieren. Außerdem lässt sich die markierungsfreie Selektion einer Vielzahl von Virenklonen, die das Resultat eines massiv parallelen Screeningansatzes im Ergebnis mit sich bringt, mit der verfügbaren Technik nicht bewerkstelligen.

[0066] Das nun zu beschreibende Verfahren hat daher das Ziel, ein hochparallelisierbares Verfahren zur Selektion und Identifizierung von Peptid- oder Proteinmolekülen, die spezifisch mit bestimmten anderen Molekülen unter Ausbildung einer Bindung interagieren können, wobei die Nachteile des Standes der Technik vermieden oder verringert werden.

[0067] Dies wird erreicht durch ein Verfahren zur Selektion und Identifizierung von mindestens einem Vertreter (Interaktionspartner) aus einer Vielzahl von Peptid- oder Proteinmolekülen, der spezifisch mit mindestens einem Vertreter aus einer Vielzahl von Molekülen unter Ausbildung einer Bindung interagieren kann, umfassend die Schritte:

(a) Inkontaktbringen eines Virensystems aus einer Vielzahl von Viren, von denen jedes Virus jeweils mindestens einen Vertreter aus der Vielzahl der Peptid- oder Proteinmoleküle an seiner Oberfläche präsentiert, mit der Vielzahl von in einem zweidimensionalen Raster positionsadressierbar auf der Oberfläche eines Festphasenträgers immobilisierten Molekülen (Liganden);

(b) Entfernen von nicht gebundenen Viren von der Oberfläche; und

(c) Identifizieren des Interaktionspartners durch Nachweis und Positionsbestimmung der Bindung zwischen immobilisiertem Ligand und dem vom Virus präsentierten Interaktionspartner mit Hilfe eines markierungsfreien Detektionsverfahrens.

[0068] Hierbei werden die Liganden in einem zweidimensionalen Array wie in Fig. 1 gezeigt, auf dem spezifisch ausgestalteten Festphasenträger bzw. Sensorflächenträger immobilisiert, der eine markierungsfreie Detektion von Interaktionspartnern mittels SPR ermöglicht. Dadurch können die Selektion und Detektion des Selektionserfolges in einem Meßsystem durchgeführt werden. Die detektierten, interagierenden Viren können in sich anschließenden Verfahrensschritten weiterbehandelt und gegebenenfalls vermehrt werden, wobei man hierzu entweder alle gebundenen Viren oder nur solche, die an für die jeweilige Selektion ausge-

wählten Oberflächenfelder gebunden haben, verwendet. Weiterhin vorteilhaft an einem markierungsfreien Detektionsverfahren ist, dass die direkte Bindung zwischen Ligand und auf dem Viren präsentierten Peptid oder Protein nachgewiesen wird. Dies ist bei der Verwendung von Marker-basierten Detektionsmethoden nicht der Fall.

[0069] Da die Vielzahl von Liganden in einem zweidimensionalen Raster immobilisiert wird, ermöglicht dieses vorteilhafte Verfahren in Verbindung mit einem geeigneten Meßsystem zudem eine parallele Detektion mit hoher Integrationsdichte. Dadurch wird ein in hohem Maße miniaturisiertes und parallelisiertes Phage Display Verfahren bereitgestellt, so dass die Detektion für mehrere oder alle Liganden parallel erfolgen kann.

[0070] Vorteilhaft ist weiterhin, dass die aus der Vermehrung der Phagenbibliothek resultierenden Kulturüberstände/Lysate unmittelbar in dem Screeningprozess verwendet werden können und somit die zeitintensive Anreicherung der Viren aus dem Kulturüberstände/Lysat nicht notwendig ist. Von Vorteil ist zudem, dass die Selektion in einem gemeinsamen Probenvolumen stattfindet und somit eine konkurrierende, zeitgleiche Selektion gegen eine Vielzahl von Liganden durchgeführt werden kann.

[0071] Bevorzugt werden Schritt (a) und (c) auf derselben Oberfläche des Festphasenträgers durchgeführt, wobei die Liganden in einem kartesischem Raster (Array) auf der Oberfläche des Festphasenträgers immobilisiert sind, so dass die Position eines jeden Liganden durch seine x- und y-Koordinaten auf dem Array bestimmbar ist. Man kann auch eine Vielzahl positionsadressierbarer Oberflächenfelder, auch als Ligandfelder bezeichnet, auf dem Festphasenträger vorsehen, worauf die Liganden immobilisiert werden. Die in Schritt (a) nicht gebundenen Viren werden in Schritt (b) bevorzugt durch Elution entfernt.

[0072] In einer weiteren Ausführung des Verfahrens enthält der Festphasenträger eine polymerfreie Oberfläche, auf der die Liganden immobilisiert werden. Aufgrund der sehr hohen Proteinadsorptionsresistenz dieser polymerfreien Oberfläche ist es möglich, relativ schwache Wechselwirkungen, d. h. Bindung zwischen Ligand und vom Virus präsentiertes Protein- oder Peptidmolekül zu beobachten, was insbesondere die Verwendung von niedermolekularen Liganden ermöglicht.

[0073] Bevorzugt erfolgt für die Vermehrung der Viren die Infektion der Wirtszellen durch die an die Oberfläche des Festphasenträgers gebundenen Viren. Dies hat den Vorteil, dass die Bindung zwischen Ligand und Viren-präsentiertem Peptid oder Protein nicht aufgehoben werden muss.

[0074] Das Verfahren erlaubt die Selektion und Identifizierung von einem oder auch mehreren Vertretern von Peptid- oder Proteinmolekülen aus einer Vielzahl derartiger Moleküle. "Vertreter" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass jedes unterschiedliche Peptid- oder Proteinmolekül in der Molekülvielfzahl üblicherweise nicht als Einzelmolekül vorkommt, sondern in der Proteinnischung in mehr oder weniger großer Menge vorhanden ist. Das Selektions- und Identifizierungsprinzip beruht dann darauf, dass das gesuchte Peptid- oder Proteinmolekül unter Ausbildung einer Bindung mit einem oder mehreren vorher ausgewählten "Selektionsmolekülen" interagieren kann. Diese Selektionsmoleküle sind hinsichtlich ihrer Natur nicht besonders eingeschränkt und können von beliebiger Struktur sein, so lange sie sich überhaupt in einem derartigen Test handhaben lassen und zur Ausbildung einer Bindung in der Lage sind. Hier werden sie daher einfach auch als "Moleküle" bezeichnet. Für diejenigen Moleküle auf der Oberfläche des Festphasenträgers immobilisiert sind, wird im Kontext der vorliegenden Beschreibung auch der Begriff "Ligand" verwendet.



det. Ein Peptid- oder Proteinmolekül, dass zur Interaktion, d. h. Bindung and den Liganden in der Lage ist und auf diese Weise selektiert und identifiziert werden kann, wird auch als "Interaktionspartner" bezeichnet.

[0075] Unter den Begriffen "Identifizierung" und "Selektion" wird im Zusammenhang mit der vorliegenden Beschreibung eine Anreicherung, vorzugsweise eine Individualisierung von "Interaktionspartnern" verstanden. Folglich ist sowohl die Identifizierung von Interaktionspartnern in einer großen Vielzahl oder Population beliebig unterschiedlicher Interaktionspartner, als auch die Selektion einzelner in einer vorher bereits angereicherten Population umfasst.

[0076] Die Interaktion zwischen Interaktionspartner und Ligand, die sich in Form einer Bindung zwischen den Partnern manifestiert, kann beispielsweise mit einem "Schlüssel-Schloß-Prinzip" charakterisiert werden. Der Interaktionspartner (Peptid oder Protein) und das Selektionsmolekül (Ligand), besitzen Strukturen oder Motive, die spezifisch zueinander passen, wie z. B. eine antigene Determinante (Epitop), die mit der Antigen-Bindungsstelle eines Antikörpers interagiert. Durch die Kenntnis der Struktur eines der Bindungspartner lassen sich Rückschlüsse auf mögliche bevorzugte Strukturen bzw. auf spezielle Strukturelemente eines geeigneten damit interagierenden Partners ziehen.

[0077] In dem hier beschriebenen Verfahren und Meßsystem werden die Interaktionspartner an der Oberfläche von Viren als Peptide oder Proteine präsentiert. Hierbei werden alle Peptide oder Proteine umfasst, deren codierenden Nucleotidsequenzen in ein Virengenom inseriert werden können. Bevorzugt ist, dass die Expression dieser Peptide oder Proteine als Teil der Virenhülle eine Assemblierung dieser Hülle und damit eine Propagierung des Virus erlaubt. Vorzugsweise ist das propagierte Virus infektiös.

[0078] Der Begriff Peptide oder Proteine umfasst sowohl natürliche als auch synthetische Peptide oder Proteine. Beispiele für natürliche Proteine umfassen u. a. Antikörper, Antikörperfragmente, Rezeptoren, die mit ihren spezifischen Liganden interagieren, peptidische Liganden, die mit ihren spezifischen Rezeptoren oder Peptidomänen, die mit spezifischen Substraten, einschließlich Proteinen und Coenzymen, und anderen Peptiden oder Enzymen etc. interagieren. Ebenfalls umfasst sind hiernit rekombinant hergestellte Formen der vorgenannten Proteine oder Peptide. Natürliche Peptide umfassen entsprechend unter anderem Fragmente der oben beschriebenen Proteine, die mit spezifischen Liganden interagieren. Synthetische Proteine oder Peptide umfassen sowohl zur Expression gebrachte Pseudogene oder Fragmente davon, als auch Proteine oder Peptide mit einer zufälligen Aminosäuresequenz. Die Peptide und Proteine sind somit vorzugsweise Bestandteil einer aus Viren bestehenden Bibliothek, wobei die Viren, vorzugsweise in ihr Genom integriert, eine Nucleinsäuresequenz enthalten, die das entsprechende Peptid bzw. Protein codiert. Dabei liegt diese Nucleinsäuresequenz typischerweise so vor, dass sie bei Expression zur Synthese des Peptids bzw. Proteins als Bestandteil eines Fusionsproteins führt, das aus einem Hüllprotein des Virus oder einem Teil davon besteht und aus dem Peptid bzw. Protein. Dieses Fusionsprotein hat dann die Fähigkeit, auf der Oberfläche des Virus lokalisiert zu sein und folglich das Peptid bzw. Protein zu präsentieren.

[0079] Der Begriff "Ligand" beschreibt im Zusammenhang mit dem hier beschriebenen Verfahren bzw. Meßsystem Moleküle oder Verbindungen, die auf der Oberfläche eines Festphasenträgers immobilisiert werden. Der Begriff umfasst Makromoleküle als auch "kleine organische Moleküle". Weiter werden im Kontext der vorliegenden Erfindung als Ligand allgemein Strukturelemente bezeichnet, die

aufgrund ihrer strukturellen Eigenarten Wechselwirkungen mit auf Viren präsentierten Peptiden oder Proteinen eingehen können. Durch die Kenntnis der Struktur der Liganden lassen sich so unter anderem Rückschlüsse auf die mögliche Struktur bzw. auf spezielle Strukturelemente des auf dem Viren präsentierten Moleküls ziehen.

[0080] Unter dem Begriff "Makromoleküle" werden Moleküle mit einer hohen molekularen Komplexität oder einem hohen Molekulargewicht verstanden. Vorzugsweise sind dies Biomoleküle, wie z. B. Biopolymere, insbesondere Proteine, Oligo- oder Polypeptide, aber auch DNA, RNA, Oligo- oder Polynucleotide, Isoprenoide, Lipide, Kohlenhydrate (Glycoside), sowie deren Modifikationen, sowie auch synthetische Moleküle. Im Zusammenhang mit Proteinen kommen insbesondere Rezeptoren in Betracht, aber auch Proteine oder Peptide, die Epitope oder antigene Determinanten von Proteinen repräsentieren. Ferner können die Proteine auch Fusionsproteine sein.

[0081] Unter dem Begriff "kleine Moleküle" oder "niedermolekulare Moleküle" werden Moleküle verstanden, die von geringerer molekularer Komplexität sind, als die oben definierten Makromoleküle. In der Literatur wird der Begriff "kleine Moleküle" ("small molecules") oder "niedermolekulare Moleküle" ("low molecular weight molecules") nicht einheitlich verwendet. In WO 89/03041 und WO 89/03042 werden Moleküle mit Molekülmassen bis 7000 g/mol als kleine Moleküle beschrieben. Üblicherweise werden jedoch Molekülmassen zwischen 50 und 3000 g/mol, häufiger aber zwischen 75 und 2000 g/mol und meistens im Bereich zwischen 100 und 1000 g/mol angegeben. Beispiele sind dem Fachmann aus den Schriften WO 86/02736, WO 97/31269, US-A-5928868, US-A-5242902, US-A-5468651, US-A-5547853, US-A-5616562, US-A-5641690, US-A-4956303 und US-A-5928643 bekannt.

[0082] Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung wird die Bezeichnung "kleine organische Moleküle" für Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 3000 g/mol, bevorzugt unter 1000 g/mol, am meisten bevorzugt unter 750 g/mol verwendet. Als Beispiele für solche kleinen Moleküle können Oligomere oder auch kleine organische Moleküle angeführt werden, wie Oligopeptide, Oligonucleotide, Kohlenhydrate (Glycoside), Isoprenoide, Lipidstrukturen oder Haptene. In der Literatur stellt zumeist das Molekulargewicht die Definitionsgrundlage für solche kleinen organischen Moleküle dar.

[0083] Ein Aspekt des hier beschriebenen Verfahrens bzw. verwendeten Meßsystems betrifft die Bereitstellung eines zweidimensionalen Arrays mit einer Vielzahl von Liganden auf einem erfindungsgemäßen SPR-Sensorflächenträger. Dabei werden die Liganden in dem Array derart angeordnet, dass die Identität eines jeden Liganden durch seine x- und y-Koordinaten auf dem Array bestimmbar ist.

[0084] Die räumliche Struktur des entstehenden Arrays wird durch eine mechanische Strukturierung der Träger vorgegeben, welche daher bevorzugt eine Vielzahl regelmässig angeordneter, positionsadressierbarer Felder (Ligandfelder) aufweisen. Diese Ligandfelder enthalten eine oder mehrere Kavitäten (Sensorfelder), auf deren Boden die Liganden immobilisiert werden. Vorzugsweise besitzen die Kavitäten eine Tiefe von 20–100 µm.

[0085] Bevorzugt unterscheiden sich diese Ligandfelder jeweils in der Art der auf ihren Sensorfeldern immobilisierten Interaktionspartner, wobei ein einzelnes Ligandfeld sowohl einen einzigen Liganden als auch mehrere gleiche oder unterschiedliche Liganden präsentieren kann. In einem typischen Beispiel werden pro Ligandfeld vier Interaktionspartner immobilisiert.

[0086] Bevorzugt sind die Kavitäten derart angeordnet,



dass auf dem Träger ein regelmässiges, vorzugsweise kartesisches Raster von Spalten und Streifen entsteht. Die Grösse und Form des Trägers kann beliebig gewählt und leicht an das verwendete Detektionssystem angepasst werden. Bei Verwendung von Spottingrobotern für die Immobilisierung der Liganden und/oder bei Vorliegen der Liganden in Mikrotiterplatten ist der Abstand der Felder zueinander bevorzugt dem verwendeten Mikrotiterformat oder dem Format der verwendeten Spottingeinrichtung anzupassen. Die Anzahl der Felder auf dem Festphasenträger kann die Anzahl der Untereinheiten der Mikrotiterplatte auch überschreiten, d. h. die Dichte der Sensorfelder auf dem Festphasenträger kann ein Vielfaches höher sein als die Dichte der Untereinheiten der Mikrotiterplatte. So kann beispielsweise ein rechteckiger Festphasenträger 6144 Feldern besitzen, die mittels eines Spottingroboters aus vier konventionellen 1536er Mikrotiterplatten belegt werden können.

**[0087]** Um den Durchsatz beim Screening erhöhen zu können, ist es vorteilhaft, eine möglichst große Anzahl an Liganden zu immobilisieren. Hierbei kann eine Anzahl von mindestens 10, bevorzugt 96, besonders bevorzugt 384, ganz besonders bevorzugt 1536, noch mehr bevorzugt 4608, am meisten bevorzugt 9216 verschiedenen Vertretern von Liganden immobilisiert werden. Im Rahmen des vorliegenden Verfahrens ist es auch möglich, gleiche Liganden mehrfach zu immobilisieren. Dies kann zum Beispiel für Mehrfachbestimmungen der Ligand-Viren-Interaktion sinnvoll sein, um die Qualität des Selektionsprozesses zu beurteilen. Die angegebenen Zahlen berücksichtigen somit nur die untereinander unterschiedlichen Liganden. Ebenfalls muß berücksichtigt werden, daß zur Immobilisierung der Liganden verschiedene Stellen des Liganden benutzt werden können. Somit erhält der Ligand auf der Oberfläche eine andere Orientierung und kann mitunter ein anderes Bindungsverhalten zeigen. Erfindungsgemäß werden vereinfachend auch unterschiedliche Orientierungen eines Liganden als "unterschiedliche" Liganden verstanden.

**[0088]** Da Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) zum Nachweis von Interaktionen verwendet wird, ist eine kostengünstige Strukturierung der Sensorfelder dadurch zu erreichen, dass nicht der Sensor selbst (vorzugsweise ein Prisma) als Festphasenträger verwendet und direkt strukturiert wird (siehe Fig. 1a), sondern stattdessen eine separater Probensträger als Festphasenträger zur Ligandimmobilisierung verwendet wird, welcher auf den Sensor gelegt wird, siehe Fig. 1b und zugehörige Beschreibung.

**[0089]** Die Immobilisierung des Liganden kann direkt oder indirekt auf dem Festphasenträger erfolgen. Es gibt mehrere Möglichkeiten der Anbindung von Liganden an eine feste Oberfläche. Hierbei sind beispielhaft eine kovalente, ionische oder adsorptive Anbindung zu nennen. Besonders bevorzugt ist die kovalente Anbindung des Liganden auf dem Träger, da diese chemische Bindung so stabil ist, dass sie eine vollständige Denaturierung anhaftender Proteine ohne Beeinträchtigung der Oberflächeneigenschaften zulässt.

**[0090]** Der Ligand kann unverändert oder chemisch modifiziert eingesetzt werden. Chemische Modifikation umfasst das Verändern vorhandener Reaktivitäten, etwa das Aktivieren vorhandener funktioneller Gruppen oder das Hinzufügen eines weiteren Moleküls, das die direkte oder indirekte Anknüpfung an die Oberfläche ermöglicht. Hierzu können einfache Additions- oder Substitutionsreaktionen dienen.

**[0091]** Um häufig auftretende ungewünschte unspezifische Anbindung des Liganden an die Oberfläche des Trägers, insbesondere wenn dieser aus einer Kunststoff- oder Metalloberfläche besteht, zu vermeiden oder zu vermindern, ist eine organische Zwischenschicht vorteilhaft. Häufig wird

hier eine selbstassemblierende Monoschicht (SAM) verwendet, die eine Adsorption des Liganden auf dem Träger vermeidet. Die Selbstorganisation zu einem dichten Film erfolgt normalerweise durch hydrophobe Wechselwirkung langkettiger Kohlenwasserstoffe an deren einem Ende eine funktionelle Gruppe vorhanden ist, die die Anbindung an den Träger ermöglicht und deren anderes Ende eine funktionelle Gruppe enthält, die die Bindung des Liganden ermöglicht. Verbindungen, die diese funktionellen Bausteine umfassen (Kopf-, Fußgruppe, hydrophober Teil), werden auch Anker genannt. Weiterhin kann der Anker einen Spaceranteil besitzen, der bevorzugt Ethylenglykoleinheiten enthält, die eine geringe unspezifische Proteinadsorption gewährleisten.

**[0092]** Vorteilhafterweise werden zu den erwähnten Anker-molekülen noch sogenannte Verdünnermoleküle zugesetzt, um die Konzentration auf der Oberfläche zu steuern. Eine zu dichte Oberflächenkonzentration kann durch sterische Hinderung nachteilig sein. Verdünnermoleküle sind strukturell den Anker-molekülen angepaßt, jedoch besitzen sie keine Kopfgruppe für die Anbindung des Liganden, da dieses vermieden werden soll. Weiterhin sind sie üblicherweise kürzer als die Anker-moleküle, um eine Beeinträchtigung der Erreichbarkeit des Liganden für das auf dem Virus präsentierte Peptid oder Protein zu vermeiden.

**[0093]** Im Stand der Technik wird häufig zusätzlich auf die organische Zwischenschicht ein Polymer, wie z. B. Dextran, aufgebracht. Wegen der möglichen unerwünschten Wechselwirkung zwischen diesem Polymer und dem Liganden ist eine polymerfreie Oberfläche bevorzugt. Vorteilhaft an einer polymerfreien Oberfläche ist weiterhin, dass aufgrund der geringen unspezifischen Proteinbindung auf den Einsatz von Blockierungsreagenzien beim Selektionsprozess verzichtet werden kann. Dies ist besonders vorteilhaft, da diese Blockierungsreagenzien ebenfalls unspezifische Proteinbindung aufweisen, welche somit vermieden wird. Ein weiterer Vorteil von polymerfreien Oberflächen ist, dass sie sehr einfach regeneriert werden können. Dazu können Reagenzien, die eine Regeneration der Oberfläche in einem Einstufenverfahren ermöglichen (z. B. SDS-haltige Lösungen oder Methanol-Trifluoressigsäuremischungen), verwendet werden.

**[0094]** Einstufenverfahren können zur Regeneration der im Stand der Technik verwendeten Polymeroberflächen nicht eingesetzt werden, da die dabei eingesetzten Reagenzien die Struktur der Polymere verändern, zerstören oder zur Ablösung der Polymere vom Träger führen. Auf einer polymerfreien Oberfläche hingegen ist man in der Auswahl der Regenerationsmittel lediglich hinsichtlich der Stabilität des Liganden eingeschränkt.

**[0095]** Beispielsweise können SANs durch Chemisorption von Alkylthiolen auf einer Metalloberfläche (z. B. Gold) erzeugt werden. Die langkettigen Moleküle packen sich als SAM auf die Festphase, wobei die Goldatome von den Schwefelfunktionen komplexiert werden. Ein weiteres Beispiel ist die Silanisierung von Glas oder Silizium mit reaktiven Epoxid- oder Aminogruppen-haltigen Silanen, anschließende Acylierung der Aminogruppen, beispielsweise mit Nukleosidderivaten (Maskos und Southern, Nucl. Acids Res. 20 (1992) 1679-84).

**[0096]** Zur Synthese von Anker und Verdünnermolekülen sei auf WO 00/73796 A2 und DE 100 27 397.1 verwiesen, auf deren Offenbarungsgehalt hiermit vollinhaltlich Bezug genommen wird.

**[0097]** Das Aufbringen der zu immobilisierenden Liganden beschränkt sich nicht auf spezielle Verfahren. Zur genaueren Lokalisierung der aktiven Stellen auf der Oberfläche können z. B. herkömmliche Pipettier- oder Spottingvor-

richtungen, aber auch Stempel- oder Ink-Jet-Verfahren aufgebracht werden.

**[0098]** Das Entfernen der nicht interagierenden Viren gemäß Schritt (b) des erfindungsgemässen Verfahrens kann nach herkömmlichen, dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen. Bevorzugt werden die nicht interagierenden Viren durch Elution von der Oberfläche entfernt. Entsprechend der oben definierten "Interaktion" werden durch den Ausdruck "nicht interagierende Viren" solche Viren umfaßt, die nicht mit dem/den immobilisierten Affinitätsligand(en) in Wechselwirkung treten, d. h. keine Bindung mit dem Ligand eingehen. Ein Elutionsverfahren ist z. B. ein Waschverfahren. Hierbei kann die Oberfläche z. B. mit geeigneten Lösungen behandelt werden, deren Zusammensetzung gewährleistet, daß die Wechselwirkung des Interaktionspartners mit dem Zielmolekül nicht aufgelöst wird. In diesem Zusammenhang sind auch unterschiedlich stringente Elutionsbedingungen umfaßt, bei denen beispielsweise niederraffine Wechselwirkungen aufgelöst werden und es somit zu einer Anreicherung oder Identifikation von hochaffinen Interaktionspartnern kommt. Solche Beispiele sind aus dem Stand der Technik bekannt, z. B. z. B. in T7Select® System Manual, Fa. Novagen, Madison (USA) (TB178 06/00), S. 14 ff.

**[0099]** Weiterhin ist bevorzugt, dass man nach Schritt (b) die Schrittfolge (a), (b) ein oder mehrfach wiederholt bevor der Nachweisschritt (c) erfolgt. Insbesondere ist es bevorzugt, die Weiterbehandlungs- und Vermehrungsschritte ein oder mehrfach durchzuführen, d. h. man wiederholt nach Schritt (b) die Schrittfolge (d), (e), (a), (b) ein oder mehrfach bevor der Nachweisschritt (c) erfolgt. Um zu überprüfen, dass wirklich Bindung stattgefunden hat und die entsprechenden Ligandfelder auszuwählen, kann man vor Schritt (d) den Schritt (c) durchführen. Durch die Wiederholung dieser Schrittfolgen wird eine selektive Anreicherung von Viren gewährleistet, die Interaktionspartner der immobilisierten Liganden an ihrer Oberfläche präsentieren.

**[0100]** Der Nachweis der Wechselwirkung zwischen den Liganden und den von den Viren präsentierten Interaktionspartnern gemäß Schritt (c) des erfindungsgemässen Verfahrens kann nach herkömmlichen, dem Fachmann bekannten Detektionsmethoden erfolgen, bei denen gewährleistet ist, dass Viren, die im Selektionsprozess detektiert wurden, in den weiteren Verfahrensschritten verwendet werden können. Dies ist bei der Verwendung von markierungsfreien Detektionsmethoden der Fall.

**[0101]** Bei der Verwendung eines in Zusammenhang mit den Fig. 1 bis 3 beschriebenen SPR-Sensorflächenträgers in dem Selektions/Identifizierungs-Verfahren beruht der markierungsfreie Nachweis der Wechselwirkung zwischen den Liganden und den von den Viren präsentierten Interaktionspartnern in Schritt (c) auf Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).

**[0102]** Sehr vorteilhaft ist der Umstand, dass aufgrund der Verwendung einer markierungsfreien Detektionsmethode sowohl für den Selektionsprozess als auch für den Nachweis von Bindungsereignissen dieselbe Oberfläche verwendet werden kann, was nur eine einmalige Oberflächenevaluation erfordert und ausserdem eine identische Ligandpräsentation ermöglicht.

**[0103]** Zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen den auf den Sensorfeldern immobilisierten Liganden und den auf den Viren präsentierten Interaktionspartnern mittels SPR werden die Sensorfelder auf einen ortsauflösenden Detektor abgebildet wird. Dabei kann jedes einzelne der Sensorfelder als separate Messoberfläche genutzt werden, d. h. die Bindung der Phagenpartikel kann für jedes Sensorfeld separat detektiert werden. Der Detektor sollte zur parallelen Erfassung aller Bindungsereignisse in der Lage sein und die

Detektion selbst sollte parallel erfolgen. Vorteilhafterweise ist der Detektor eine CCD-Kamera. Vorteilhaft an der parallelen Selektion ist, dass sie die Vergleichbarkeit der einzelnen Meßergebnisse untereinander fördert.

**[0104]** Damit auf dem detektierten Bild die Sensorfelder mit gutem Kontrast sichtbar werden, sollte das an den Zwischenbereichen der Ligandfelder ankommende Licht in möglichst starkem Maß absorbiert, weggestreut oder in eine andere Richtung als die Detektionsrichtung weggeleitet werden. Dies wird in den erfindungsgemässen SPR-Sensorflächenträgern durch die Trennmittel **105** gewährleistet. Erst dieser Kontrast zwischen Sensorfeld und Berandung erlaubt es, eine Zuordnung der Pixelbereiche im Bild zu einem Sensorfeld zu definieren. Über die Pixel eines Bereichs im Bild wird während der Datenaufnahme summiert, so dass bei guter Absorption der Zwischenbereiche auch die Spektren für die Sensorfelder aussagekräftiger werden.

**[0105]** Eine Justierung des Systems ist auf einfache Weise möglich, da zunächst die Sensoranordnung (mit oder ohne Proben auf den Sensorfeldern) in das Messsystem eingelegt wird, und dann eine Abbildung mit Strahlung einer beliebigen Einstrahlungsbedingung gemacht wird, wobei der Kontrast eine Unterscheidung der einzelnen Sensorfelder voneinander, bzw. der Sensorfelder von den Trennmitteln gestattet. Verschiedene Möglichkeiten der Eliminierung des Lichts an den nicht gewünschten Stellen mittels Trennmitteln sowie ein Messsystem zur parallelen Detektion werden in der bereits erwähnten WO 01/63256 beschrieben.

**[0106]** Der Weiterbehandlungsschritt (d) kann einen der folgenden Schritte umfassen:

- (d1) Elution aller gebundenen Viren;
- (d2) Elution der Viren, die an Liganden ausgewählter Oberflächenfelder gebunden sind;
- (d3) Zugabe von Wirtszellen auf die gesamte Oberfläche;
- (d4) Zugabe von Wirtszellen auf ausgewählte Oberflächenfelder.

**[0107]** In Schritt (d1) werden die interagierenden Viren von der Oberfläche eluiert und zur Infektion einer Wirtszellkultur zugegeben.

**[0108]** In Schritt (d3) werden Wirtszellen auf die gesamte Oberfläche zugegeben und durch die interagierenden Viren infiziert, gefolgt von der Elution der infizierten Wirtszellen von der Oberfläche. Vorteilhaft an der Infektion auf der Oberfläche ist, dass die Ligand-Viren-Komplexe nicht aufgelöst werden müssen.

**[0109]** In Schritt (d2) und (d4) werden nur Viren eluiert, die mit den auf bestimmten ausgewählten Sensorfeldern immobilisierten Liganden interagiert haben. Dies wird bevorzugt durch den spezifisch ausgestalteten Volumenelementträger **10** erreicht, der hierfür als Körper mit Ausnehmungen bzw. Bohrungen als Gittermaske ausgestaltet ist, die auf dasjenige Ligandfeld aufgebracht wird, welches den/die interagierenden Liganden enthält. Die Ausnehmungen der Gittermaske sind in demselben zweidimensionalen Raster wie die Ligandfelder auf dem Träger ausgerichtet. Der Abgleich beider Raster wird durch die Justierungsvorrichtung (z. B. Passstifte) in der Gittermaske (Volumenträger) und dem Trägerhalter erreicht.

**[0110]** In Schritt (d2) wird ein Eluenz in diejenigen Aussparungen der Gittermaske gegeben, welche Ligandfelder umschliessen, die mit Viren interagierende Interaktionspartner auf ihren Sensorfeldern enthalten, gefolgt von der Elution der interagierenden Viren von der Oberfläche.

**[0111]** In Schritt (d4) werden Wirtszellen in die Aussparungen der Gittermaske gegeben, welche Sensorfelder enthalten, mit welchen Viren interagiert haben, gefolgt von der Elution der infizierten Wirtszellen von der Oberfläche.

**[0112]** In einer bevorzugten Ausführungsform werden in

Schritt (d2) oder (d4) die interagierenden Viren oder infizierten Wirtszellen mehrerer Aussparungen gemeinsam vermehrt.

[0113] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Verfahren ferner einen Vermehrungsschritt (e), der im Anschluß an Schritt (d) ausgeführt wird:

(e) Vermehren der interagierenden Viren durch Infektion eines Wirts.

[0114] Die Vermehrung der Viren erfolgt durch eine Ausverdünnung der infizierten Zellen in einer Vorkultur des Wirtstammes und dem anschließenden Wachstum der Kultur bis zur Lyse.

[0115] Bedingungen für eine Vermehren der interagierenden Viren durch Infektion eines Wirts sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt, z. B. in T7Select® System Manual, Fa. Novagen, Madison (USA) (TB178 06/00), S. 18 ff.

[0116] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Verfahren ferner einen Charakterisierungsschritt (f) der entweder im Anschluß an Schritt (c) oder im Anschluß an Schritt (e) ausgeführt wird:

(f) Charakterisierung der Bindung der selektierten Virenpopulationen sowie einzelner aus diesen Virenpopulationen stammender Virenclone an den für die Selektion verwendeten Liganden in einem Assay.

[0117] Als Assay kommt hierbei jede Art von Assay in Betracht, die geeignet ist, eine Bindung zu charakterisieren. Bevorzugt ist ein solcher Assay ein Festphasenassay. In der Literatur bekannte Verfahren sind beispielsweise ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays), RIA (Radioimmuno-Assay) sowie Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)- oder Schwingungsresonanz-Verfahren (Butler, J. E., METHODS 22, 4-23 (2000)).

[0118] In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Charakterisierung der Bindung in Schritt (f) auf der gleichen oder identischen Oberfläche, auf der die Virenpopulation sowie die einzelnen aus dieser Virenpopulation stammenden Virenclone identifiziert und selektiert wurden.

[0119] Darüber hinaus umfaßt eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ferner den Isolierungs- und Sequenzierungsschritt (g):

(g) Isolierung und Sequenzierung des für das Peptid oder Protein des Interaktionspartner codierenden DNA-Abschnittes einzelner Virenclone.

[0120] Dem Fachmann sind aus dem Stand der Technik geeignete Verfahren bekannt, die es ihm ermöglichen, nach der Isolierung einzelner Virenclone die in diese insertierten DNA-Sequenzen, die die entsprechenden Peptide bzw. Proteine codieren, zu isolieren und zu analysieren.

[0121] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Verfahren darüber hinaus die rekombinante Expression und Isolierung oder die chemische Synthese des als Interaktionspartner des Liganden identifizierten/selektierten Peptids oder Proteins.

[0122] Dem Fachmann sind aus dem Stand der Technik verschiedene Expressionssysteme und damit Verfahren zur Expression von isolierten Nucleinsäuresequenzen und zur Isolierung der codierten Peptide und Proteine bekannt. Diese Expressionssysteme schließen prokaryontische und eukaryontische Systeme ein. (Siehe hierzu u. a. Kapitel 9.4 Expressionssysteme in: Mühlhardt, Der Experimentator: Molekularbiologie, Gustav Fischer Verlag 1999).

[0123] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Verfahren darüber hinaus die Charakterisierung der Bindung des rekombinant exprimierten oder chemisch synthetisierten Peptids oder Proteins gegenüber einzelnen Liganden basierend auf der Auswahl der initial verwendeten Liganden in einem Assay. Hierbei werden vorteilhafter-

weise wegen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse die gleichen Assays verwendet, wie sie bei der Überprüfung der Virenclone zum Einsatz kommen. Dies ist sinnvoll, um eine vom Virus unabhängige Bindung des selektionierten Interaktionspartners nachzuweisen.

[0124] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens erfolgt diese Charakterisierung auf der gleichen Oberfläche die zur Identifizierung/Selektionierung des entsprechenden Virus verwendet wurde.

[0125] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens und Meßsystems werden die durch die Viren präsentierten Interaktionspartner codiert von in das Virengenom insertierten DNA-Fragmenten, die eine DNA-Bibliothek bilden. Dabei enthält die DNA-Bibliothek mindestens  $10^2$ , bevorzugt  $10^3$ , noch mehr bevorzugt  $10^4$ , besonders bevorzugt  $10^5$ , ganz besonders bevorzugt  $10^6$  und am meisten bevorzugt  $10^7$  DNA-Fragmente.

[0126] In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform werden die insertierten DNA-Fragmente aus cDNA oder genomischer DNA (gDNA) isoliert oder sind synthetische Oligo- oder Polynucleotide. Darüber hinaus bevorzugt stammt die insertierte cDNA oder insertierte gDNA von einem prokaryontischen oder eukaryontischen Organismus. [0127] Der eukaryontische Organismus ist dabei bevorzugt ein Pilz, eine Pflanze oder ein tierischer Organismus, vorzugsweise ein Säuger. Bevorzugt ist der Säuger eine Maus, eine Ratte oder ein Mensch.

[0128] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die cDNA aus einem differenzierten Gewebe oder einer differenzierten Zellpopulation isoliert. Hierbei bevorzugt ist die Isolierung der cDNA aus Leber, Gehirn-, Herz- oder Brustgewebe oder -zellen. Die Gewebe oder Zellen stammen dabei vorzugsweise aus einem gesunden Organismus.

[0129] In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform stammen die Gewebe oder Zellen aus einem kranken Organismus. Bevorzugt ist die Krankheit oder das Leiden des Organismus ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Krebs, Hypertrophie und Entzündung.

[0130] Die das Virensystem bildende Viren können Wildtypviren und gentechnisch modifizierte Viren umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens umfaßt das Virensystem einen Virus, der Eukaryonten als Wirt nutzt. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Virensystem einen Virus, der Prokaryonten als Wirt nutzt. Das Virus kann einzelsträngige DNA (ssDNA Viren) aufweisen, oder bevorzugt aus der Gruppe der Viren mit doppelsträngiger DNA (dsDNA-Viren) ausgewählt sein. Weiter bevorzugt ist dieses dsDNA-Virus ausgewählt aus der Gruppe der Bakteriophagen. Darüber hinaus bevorzugt ist der Bakteriophage ausgewählt aus der Gruppe der Bakteriophagen mit Schwanz, noch weiter bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Myoviridae, Podoviridae oder Siphoviridae.

[0131] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Bakteriophage ein für Escherichia coli spezifischer Bakteriophage.

[0132] Der Bakteriophage kann auch ein filamentöser Bakteriophage sein, und ist vorzugsweise ausgewählt aus M13-, f1- und fd-Phage.

[0133] Ebenfalls bevorzugt ist ein Virensystem, umfassend einen lytischen Phagen. Bevorzugt besitzt dieser lytische Phage ein polyedrisches, insbesondere ein icosaedrisches Capsid. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der lytische Phage ein  $\lambda$ -Phage, ein T3-Phage, ein T4-Phage oder ein T7-Phage.

[0134] Das Verfahren können beispielsweise zum Epitope Mapping oder zur Peptid-Leitstruktur-Identifizierung einge-

setzt werden. Desweiteren ist das Verfahren eine ideale Methode, um Liganden zu identifizieren, die Aufreinigungsschritte effizienter machen.

[0135] Besonders vorteilhaft ist der Einsatz des Verfahrens und Messsystems zur Identifizierung von kleinen organischen Molekülen, die mit Targetproteinen oder Targetpeptiden aus dem humanem Proteom interagieren (Proteom Mapping). Die hierbei generierte Information kann vorteilhaft für die Entwicklung von "Kleinen Molekül"-Wirkstoffen verwendet werden.

#### Patentansprüche

1. SPR-Sensorflächenträger mit reiner Vielzahl von SPR-Sensorflächen (100), welche auf einem Substrat (4, 5) parallel in einer Ebene angeordnet sind, wobei Strahlung zur Anregung von Oberflächenplasmonen durch das Substrat (4, 5) geführt werden kann, um von den SPR-Sensorflächen reflektiert zu werden, und Trennmitteln (105) zur Trennung der einzelnen SPR-Sensorflächen von den jeweils benachbarten SPR-Sensorbereichen, wobei die Trennmittel für jede SPR-Sensorfläche eine jeweilige Kavität bilden, und **gekennzeichnet durch** eine Vielzahl von Messbereichen (110), wobei ein Messbereich jeweils ein oder mehr SPR-Sensorflächen umfasst, und mindestens ein Messbereich von einem Isolierbereich (120) umgeben ist, welcher keine Trennmittel (105) umfasst und ein Dichtungselement (130) aufnehmen kann, um zusammen mit einem auf den Messbereich aufzusetzenden Volumenelement (11) einen gegenüber benachbarten Messbereichen isolierten Raum über dem mindestens einen Messbereich zu bilden.
2. SPR-Sensorflächenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierbereiche an der dem Substrat (4, 5) abgewandten Oberfläche gleich beschaffen sind wie die SPR-Sensorflächen.
3. SPR-Sensorflächenträger nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die SPR-Sensorflächen und Isolierbereiche gleich beschaffen sind.
4. SPR-Sensorflächenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierbereiche an der dem Substrat (4, 5) abgewandten Oberfläche anders beschaffen sind als die SPR-Sensorflächen.
5. SPR-Sensorflächenträger nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierbereiche durch freiliegende Substratoberflächenbereiche gebildet sind.
6. SPR-Sensorflächenträger nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierbereiche mit einer dichtungsfördernden Schicht bedeckt sind.
7. SPR-Sensorflächenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennmittel (105) des mindestens einen Messbereichs, der von einem Isolierbereich (120) umgeben wird, gegenüber den SPR-Sensorflächen (100) und dem mindestens einen Isolierbereich (120) erhaben sind.
8. SPR-Sensorflächenträger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennmittel des mindestens einen Messbereichs, der von einem Isolierbereich (120) umgeben wird, eine Führung für ein Dichtungselement (130) bilden.
9. SPR-Sensorflächenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Messbereich, der von einem Isolierbereich (120) umgeben wird, einen runden oder ovalen Umfang hat.

10. SPR-Sensorflächenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass jeder der Vielzahl von Messbereiche (110) von einem zugehörigen Isolierbereich (120) umgeben wird.

11. SPR-Sensorflächenträger nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Messbereiche (110) in zwei Dimensionen adressierbar angeordnet sind.

12. SPR-Sensorflächenträger nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Messbereiche (110) in einem kartesischen Raster angeordnet sind.

13. Verfahren zur Herstellung eines SPR-Sensorflächenträgers nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch: Bilden bzw. Aufbringen der Trennmittel auf dem Substrat, so dass zwischen den Trennmitteln freie Bereiche entstehen, welche SPR-Sensorflächen und Isolierbereiche definieren, und

Aufbringen eines SPR-gereinigten Materials zumindest in den freien Bereichen, welche SPR-Sensorflächen definieren.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das SPR-gereignete Material auch in den freien Bereichen aufgebracht wird, welche Isolierbereiche definieren.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass auf die Isolierbereiche eine dichtungsfördernde Schicht aufgebracht wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Bildung der Trennmittel den Schritt umfasst ein Polymer auf der Oberfläche des Substrats aufzubringen.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Bildung der Trennmittel die Schritte umfasst:

Aufbringen eines fotostrukturierbaren Polymers auf der gesamten Oberfläche des Substrats,

Belichten der aufgetragenen Polymerschicht mit einer Maske, welche Bereiche definiert, die zu den Trennmitteln gehören, Bereiche, die zu den SPR-Sensorflächen gehören, und Bereiche, die zu den Isolierbereichen gehören, und

Bearbeiten der belichteten Polymerschicht, um in den Bereichen, die zu den SPR-Sensorflächen und den Isolierbereichen gehören, die Substratoberfläche freizulegen.

18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Bildung der Trennmittel die Schritte umfasst:

Aufbringen eines Polymers auf der Oberfläche des Substrats in einem zwei-dimensionalen Raster, das die Trennmittel, die SPR-Sensorflächen und die Isolierbereiche definiert, und

Aushärten des Polymers.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer mit einer Siebdrucktechnik aufgebracht wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Bildung der Trennmittel den Schritt umfasst eine strukturierbare Siliziumschicht auf das Substrat aufzubringen.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt der Aufbringung des SPR-gereinigten Materials den Schritt des Abscheidens eines Metalls umfasst.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass vor dem Abscheiden des Metalls eine haftungsvermittelnde Schicht aufgebracht wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 oder 22,

dadurch gekennzeichnet, dass das Metall auf der gesamten Oberfläche des strukturierten Substrats aufgedampft wird.

24. Messeinrichtung mit einem SPR-Sensorflächenträger nach einem der Ansprüche 1 bis 12,

Dichtungselementen (130), welche auf Isolierbereiche (120) aufsetzbar sind, und Volumenelementen (11), welche auf Messbereiche (110) aufsetzbar sind.

25. Messeinrichtung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Volumenelemente Bestandteile eines Volumenelementträgers (10) sind, welcher auf den SPR-Sensorflächenträger aufsetzbar ist.

26. Messeinrichtung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Volumenelementträger (10) ein Körper ist, in welchem Ausnehmungen als Volumenelemente gebildet sind.

27. Messeinrichtung nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichtungselemente Bestandteile des Volumenelementträgers sind.

28. Messeinrichtung nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass auf einer Seite des Körpers um die Öffnungen der Bohrungen Nuten vorgesehen sind, in welchen die Dichtungselemente platziert sind.

29. Messeinrichtung nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass Dichtungselemente O-Ringe sind.

30. Messeinrichtung nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichtungselemente und der Volumenelementträger einstückig ausgebildet sind.

31. Messeinrichtung nach Anspruch 25 oder einem von Anspruch 25 abhängigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der SPR-Sensorflächenträger und der Volumenelementträger jeweilige Justierelemente (13) aufweisen, welche ineinander eingreifen, um Dichtungselemente (130) mit zugeordneten Isolierbereichen (120) auszurichten.

32. Messeinrichtung nach Anspruch 25 oder einem von Anspruch 25 abhängigen Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass der SPR-Sensorflächenträger und der Volumenelementträger jeweilige Befestigungselemente (15) aufweisen, um den SPR-Sensorflächenträger und den Volumenelementträger fest miteinander zu verbinden.

33. Messeinrichtung nach Anspruch 31 und 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Justierelemente (13) und die Befestigungselemente (15) identisch sind.

34. Verwendung eines SPR-Sensorflächenträgers nach einem der Ansprüche 1 bis 12 oder der Messeinrichtung nach einem der Ansprüche 24 bis 33 in einem Verfahren zur Selektion und Identifizierung von mindestens einem Vertreter (Interaktionspartner) aus einer Vielzahl von Peptid- oder Proteinmolekülen, der spezifisch mit mindestens einem Vertreter aus einer Vielzahl von Zielmolekülen unter Ausbildung einer Bindung interagieren kann, welches Verfahren die Schritte umfasst:

- (a) Inkontaktbringen eines Virensystems aus einer Vielzahl von Viren, von denen jedes Virus jeweils mindestens einen Vertreter aus der Vielzahl der Peptid- oder Proteinmoleküle an seiner Oberfläche präsentiert, mit der Vielzahl von in einem zweidimensionalen Raster positionsadressierbar auf der Oberfläche eines Festphasenträgers immobilisierten Zielmolekülen (Liganden);
- (b) Entfernen von nicht gebundenen Viren von der Oberfläche; und

(c) Identifizieren des Interaktionspartners durch Nachweis und Positionsbestimmung der Bindung zwischen immobilisiertem Ligand und dem vom Virus präsentierten Interaktionspartner mit Hilfe von Oberflächenplasmonenresonanz.

---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---

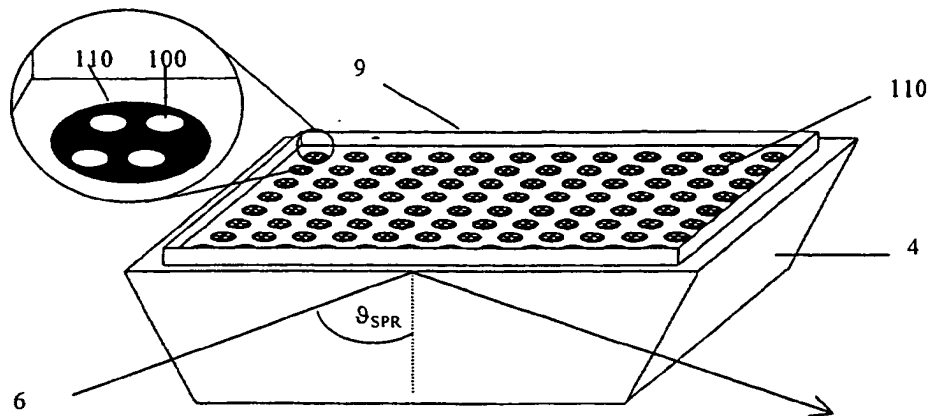


Fig. 1a

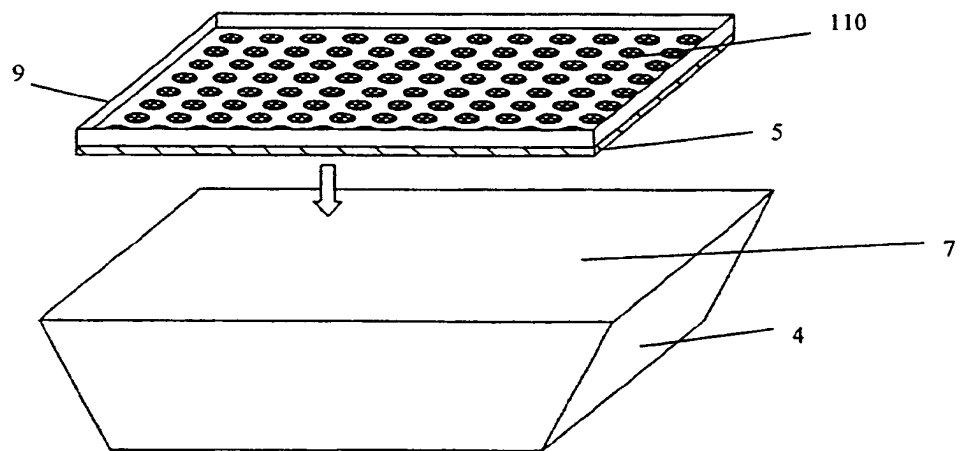


Fig. 1b

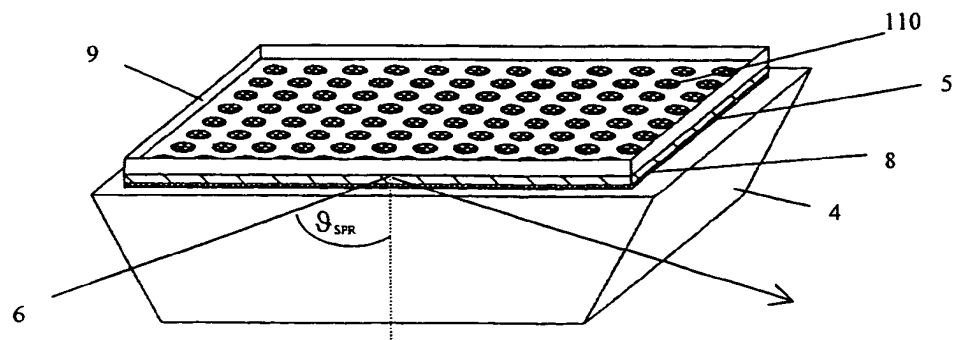
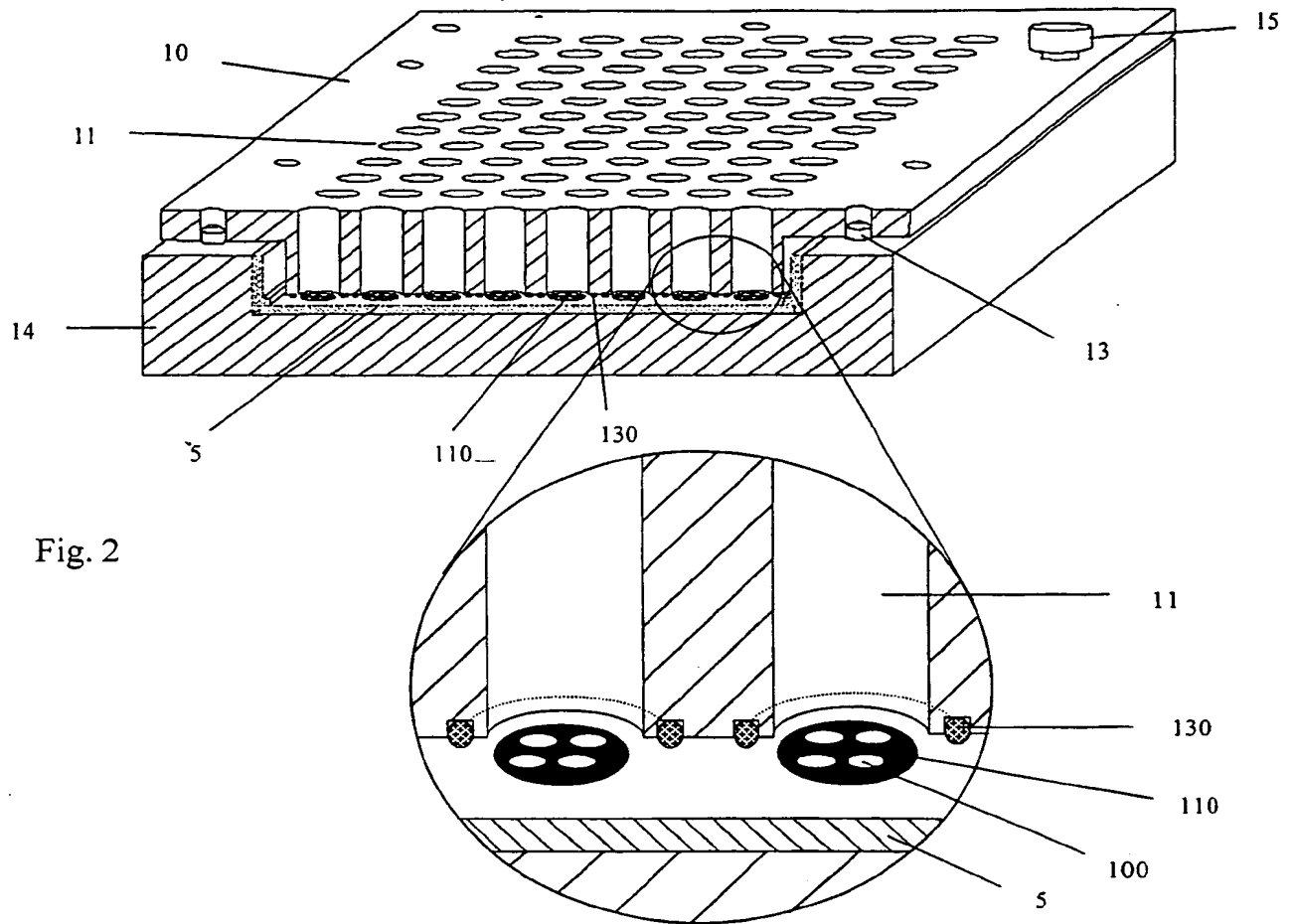


Fig. 1c





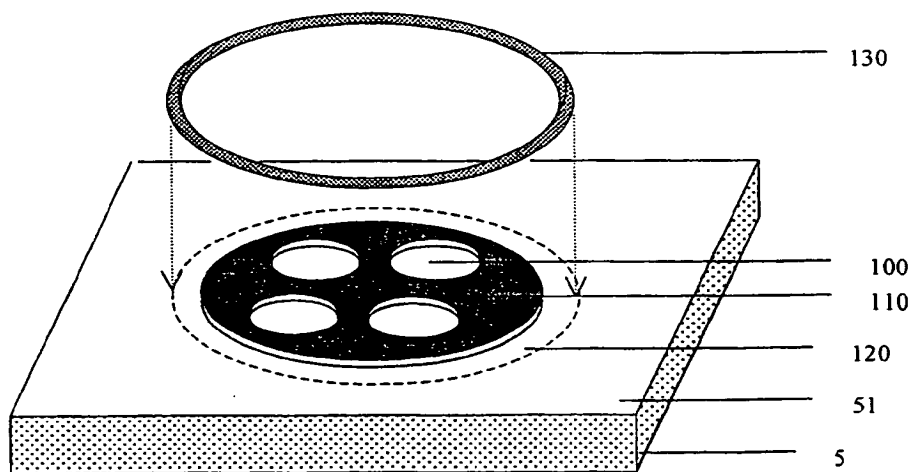
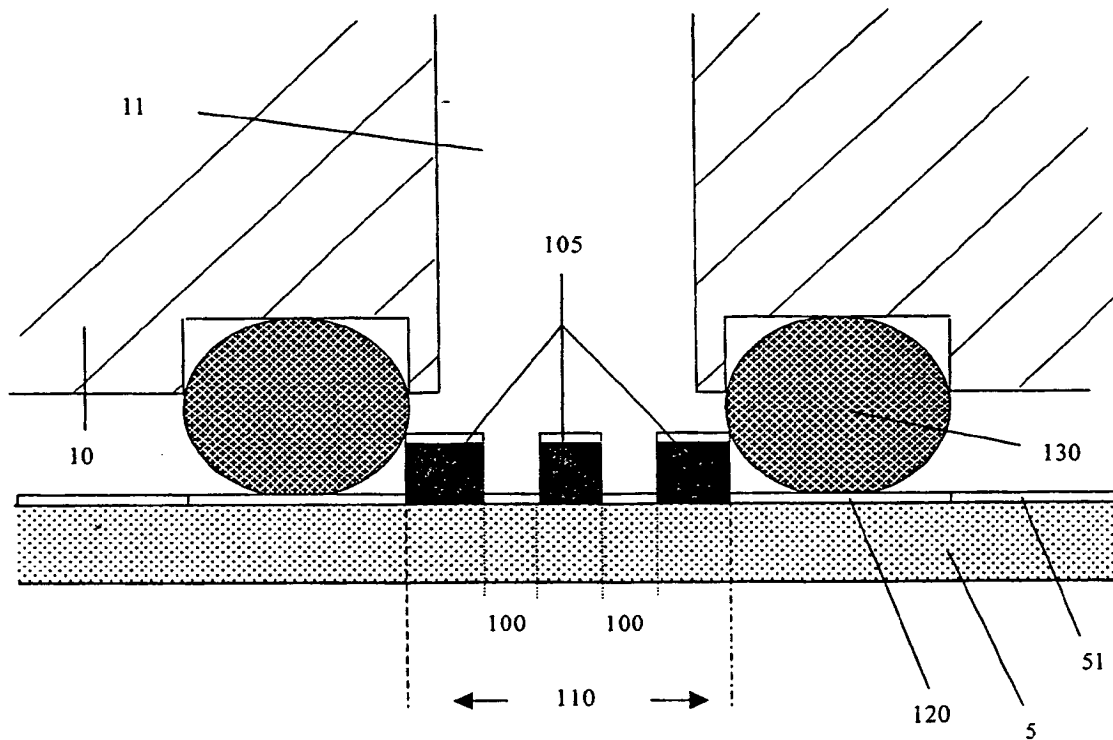


Fig. 3

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

*This Page Blank (uspto)*